

**TWO-CONSTITUENT COMPOSITIONS FOR THE *IN SITU* PRODUCTION OF CELL TRANSPLANTS THAT COMPRISE FIBROBLASTS AND KERATINOCYTES****Publication number:** DE10116362**Publication date:** 2002-10-10**Inventor:** HARTMANN ANKE (DE); FRIEDL PETER (DE)**Applicant:** BIOTISSUE TECHNOLOGIES AG (DE)**Classification:****- international:** **C12N5/06; C12N5/08; A61K35/12; C12N5/06; C12N5/08; A61K35/12; (IPC1-7): C12N5/00; A61K35/12; C12N5/08****- european:** C12N5/06B12A; C12N5/06B16**Application number:** DE20011016362 20010402**Priority number(s):** DE20011016362 20010402**Also published as:**

WO02078721 (A1)

EP1450827 (A1)

EP1450827 (A0)

**Report a data error here****Abstract of DE10116362**

The invention concerns areas involving eukaryotic cell culture and tissue engineering, particularly fibrin-containing keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions based on two constituents. The invention also relates to the use of the inventive keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions for the *in situ* production of autologous (cell) transplants. The invention particularly relates to the use of transplants for treating patients with chronic ulcers of different origins, with burn wounds, post-traumatic wound defects, and for covering defects of extensive, benign, naevoid skin changes and of scars after prior dermabrasion. The invention also relates to the use of the inventive keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions for treating postoperative wound defects after dermabrasion, excision or laser ablation of skin defects. The invention additionally relates to the accordingly produced transplants themselves, which contain keratinocytes or fibroblasts, to methods for producing the two-constituent keratinocyte composition or fibroblast composition, and to methods for producing collagen-free two-constituent compositions.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 16 362 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 5/00**  
C 12 N 5/08  
A 61 K 35/12

⑲ Aktenzeichen: 101 16 362.2  
⑳ Anmeldetag: 2. 4. 2001  
㉓ Offenlegungstag: 10. 10. 2002

**DE 101 16 362 A 1**

⑦ Anmelder:  
BioTissue Technologies AG, 79098 Freiburg, DE  
  
⑦ Vertreter:  
Ricker, M., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 81679  
München

⑧ Erfinder:  
Hartmann, Anke, 97076 Würzburg, DE; Friedl, Peter,  
97076 Würzburg, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤ Zwei-Komponenten Zusammensetzungen zur in situ Herstellung v. Fibroblasten und Keratinozyten umfassenden Zelltransplantaten

⑤ Die vorliegende Erfindung betrifft die Gebiete der eukaryotischen Zellkultur und des Tissue-Engineering, insbesondere fibrinhaltige Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen auf Zwei-Komponentenbasis. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur in situ Herstellung autologer (Zell-)Transplantate; insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Transplantate zur Behandlung von Patienten mit chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, Verbrennungswunden, posttraumatische Wunddefekten, sowie zur Defektdeckung ausgedehnter gutartiger nävöider Hautveränderungen Narben nach vorheriger Dermabrasion. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur Behandlung von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder Laserablation von Hautdefekten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die demgemäß hergestellten Keratinozyten- bzw. Fibroblasten umfassenden Transplantate selbst, sowie Verfahren zur Herstellung der Zwei-Komponenten Keratinozyten- bzw. Fibroblastenzusammensetzung, sowie Verfahren zur Herstellung von kollagenfreien Zwei-Komponenten Zusammensetzungen.

**DE 101 16 362 A 1**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Gebiete der eukaryotischen Zellkultur und des Tissue-Engineering. Die Erfindung betrifft insbesondere fibrinhaltige Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen auf Zwei-Komponentenbasis. Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur in situ Herstellung autologer (Zell-)Transplantate; insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Transplantate zur Behandlung von Patienten mit chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese (venös, arteriell, diabetisch, neuropathisch), Verbrennungswunden, posttraumatische Wunddefekten, sowie zur Defektdeckung ausgedehnter gutartiger nävöider Hautveränderungen (epidermale Nävi, Nävus papillomatosus et pilosus) und Narben (hypertrophe Narben und Keloide) nach vorheriger Dermabrasion. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur Behandlung von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder Laserablation von Hautdefekten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die demgemäß hergestellten Keratinozyten- bzw. Fibroblasten umfassenden Transplantate selbst. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung der fibrin- bzw. fibrinogenhaltigen Zwei-Komponenten Keratinozyten- bzw. Fibroblastenzusammensetzung, sowie Verfahren zur Herstellung einer kollagenfreien Zwei-Komponenten Zusammensetzung.

[0002] Der medizinisch-biotechnologische Forschungs- und Anwendungsbereich des Tissue Engineering stellt eine in den letzten Jahren immer intensiver genutzte Möglichkeit dar, verletzte bzw. fehlende Gewebestrukturen bzw. Organe durch biotechnologisch hergestellte Transplantate zu ersetzen. In diesem Zusammenhang liegt ein Schwerpunkt auf der Herstellung und Transplantation sogenannter autologer Transplantate. Das Prinzip dieser Transplantationstechnik besteht darin, daß einem Patienten Zellen des gewünschten Typs (z. B. Keratinozyten) aus einem intakten Gewebebereich (Spenderareal) entnommen, anschließend in vitro kultiviert ("expandiert") und eventuell auf einen Träger aufgebracht und schließlich in das Empfängerareal des Patienten transplantiert werden.

[0003] Prinzipiell sind jedoch autologe Transplantate aus einer Vielzahl von Zelltypen herstellbar, beispielsweise aus Haut-, Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe, sowie weiteren Gewebetypen.

[0004] Weiterhin existieren dermatologische Indikationsgebiete, die häufig die Transplantation von großflächigen Hautarealen erfordern. Hierbei sind als wichtigste Indikationen insbesondere Brandverletzungen, posttraumatische Wunddefekte, nävöide Hautveränderungen, Narben und Keloide, sowie die aufgrund der erhöhten Lebenserwartung der Bevölkerung zunehmend an Bedeutung gewinnenden chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese zu nennen.

[0005] Die bisherigen Therapiemaßnahmen bei der Transplantation von Haut basieren im wesentlichen auf den im folgenden vorgestellten Transplantationsmaterialien bzw. Verfahren.

[0006] Zur Therapie von Verbrennungen wurden von O'Connor und Mulliken (Lancet, 1981, Vol. 10, Seiten 75-78) kultivierte Keratinozyten als mehrschichtige Epidermis (sog. Cultured epidermal autografts = CEA) erstmals 1981 erfolgreich angewandt. Als epidermaler mehrschichtiger Hautersatz für Patienten mit lebensbedrohlichen Verbrennungen ist seit 1987 Epicel<sup>TM</sup> der Fa. Genzyme in USA, Canada, Deutschland, Frankreich und Japan arzneimittelrechtlich zugelassen. Die mögliche Verwendung einer prä-

formierten mehrschichtigen Epidermis wird jedoch durch eine lange Kulturdauer von ca. 4-5 Wochen vor Transplantation eingeschränkt, wobei zugleich die zu erzielende mögliche maximale Deckungsfläche (2 cm<sup>2</sup> Biopsie entsprechen ca. 30 cm<sup>2</sup> Transplantatfläche) begrenzt ist. Die dünnen und mechanisch empfindlichen Transplantate stellen hohe Anforderungen an den Operateur und erfordern einen gut vorbereiteten Wundgrund. Außerdem sind die Zellen bereits differenziert und daher nur noch eingeschränkt proliferationsfähig. Dies führt häufig zu mechanisch instabilen Regeneraten und der Notwendigkeit wiederholter Retransplantationen (Cooper, 1993). Die in diesem Verfahren auch verwendeten autologen Keratinozyten, die aus 50-100 Haarwurzeln (Epigraft, Fa. BioCare GmbH, Leipzig) gewonnen werden können, sind erst nach 6 Wochen in Form von Zellpellets verfügbar, welche jedoch keine vollständige Wundabdeckung erreichen.

[0007] Weitere aus dem Stand der Technik bekannte Transplantate stellen sogenannte Keratinozyten-Fibrinmatrix-Konstrukte dar. Die Verwendung subkonfluent kultivierter Keratinozyten erfolgt durch die Kombination bzw. Mischung proliferativ aktiver Zellsuspension mit einer Fibrinsuspension. Das Zell-Fibrinmisch wird im Wundbett vorübergehend fixiert, so dass die Keratinozyten im Wundbett migrieren, proliferieren, sich im dreidimensionalen Fibrinnetz ausrichten und unter Umbau der Fibrinmatrix eine mehrschichtige Epidermis in situ rekonstituieren können. Die erste klinische Anwendung autologer Keratinozyten als Zellsuspension in Fibrin erfolgte 1988 durch Hunyadi et al. (J. Dermatol. Surg. Oncol., 1988, Vol. 14, Seiten 75-78). Bei 16 von 20 Patienten mit Ulcera bis 25 cm<sup>2</sup> konnte eine vollständige Reepithelisierung nach nur 2 Wochen erreicht werden. Seit 1993 wird die Keratinozyten-Fibrin-Glue-Suspension (KFGS) in der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg, Abteilung Plastische und Handchirurgie, vornehmlich bei großflächigen Brandverletzungen (s. auch Stark et al., Eur. J. Plast. Surg., 1995, Vol. 18, Seiten 267-271) angewandt. Im Mausmodell zeigten KFGS-Transplantate im Vergleich zu präformierten mehrschichtigen Transplantaten (CEA, s. o.) postoperativ eine höhere mittlere Epidermisdicke und eine intakte Basalmembran mit Expression von Kollagen Typ VII, welches in der CEA-Gruppe fehlte (Horch et al., Cell Transplant., 1998, Vol. 7, Seiten 309-317). Außerdem waren bei Verbrennungspatienten, wenn CEA zur Anwendung kam, im Vergleich zur KFGS-Transplantation häufigere Retransplantationen notwendig (Stark et al., Eur. J. Plast. Surg., 1995, Vol. 18, Seiten 267-271).

[0008] Desweiteren wurden zur Transplantation dermoepidermale Allotransplantate verwendet, d. h. Transplantate, bei denen allogene Spenderzellen in einer alloplastischen oder xenogenen Stützmatrix verwendet werden. In der EU ist seit 1994 als dermales Allotransplantat bislang AlloDerm<sup>®</sup> der Fa. LifeCell Corporation zugelassen, welches aus de-epidermisierter und dezellularisierter Spenderhaut Verstorbener besteht (Wainwright et al., J. Burn Care Rehabil., 1996, Vol. 17, Seiten 124-136). Weiterhin ist das Produkt TransCyte<sup>®</sup> erhältlich, welches aus Vorhautfibroblasten in einem nicht resorbierbaren 3D-Nylongitter besteht und der temporären Defektdeckung dient, sowie Dermagraft<sup>®</sup>, bei welchem statt Nylon ein resorbierbares Vicrylgitter verwendet wird. Als erstes und bislang einziges zweischichtiges Komposithaut-Transplantat ist Apligraf<sup>®</sup> (Grafiskin) der Fa. Organogenesis/Novartis Pharma AG seit Mai 1998 in USA, Canada und in der Schweiz zugelassen. Hierbei werden in vitro Vorhautfibroblasten in Suspension mit bovinem Typ I Kollagen polymerisiert. Anschließend werden auf die kontrahierte Kollagenmatrix allogene Keratinozyten (aus

Vorhäuten Neugeborener) ausgesät, die schliesslich durch entsprechende Kulturbedingungen bereits *in vitro* eine vollständig differenzierte und verhormende Epidermisoberfläche bilden (Muhart et al., Lancet, 1997, Vol. 350, Seite 1142).  
[0009] Allerdings ergeben sich trotz der mit den oben dargestellten Verfahren erzielten Erfolge eine Reihe von bislang ungelösten Schwierigkeiten bzw. Nachteilen. Präformierte mehrschichtige epidermale Transplantate sind, da sie bereits differenziert sind, nur noch eingeschränkt proliferationsfähig und mechanisch instabil (s. z. B. CEA).

[0010] Allotransplantate (aus homologen Spenderzellen) weisen zum einen das Problem eines gewissen Infektionsrisikos auf. Weiterhin wird üblicherweise bei der Kultivierung der zu transplantierenden Zellen fetales Kälberserum (FCS) sowie als Matrix bovines Kollagen verwendet, wobei ein gewisses Infektionsrisiko mit BSE nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Die im Stand der Technik üblichen Dermisäquivalente weisen weiterhin eine präformierte Kollagenstruktur auf, die sich dem Wundareal häufig nicht optimal mechanisch und physiologisch anpassen kann, so daß kosmetisch unbefriedigende Transplantationsergebnisse erhalten werden oder sogar eine Abstoßung des Transplantates stattfindet. Außerdem ergibt sich aufgrund der Dicke der extrazellulären Matrix, insbesondere bei alloplastischen Materialien (z. B. bei 3 D-Silikon-, -Nylon-, -Vicrylgittern), aber auch bei Kollagen-Gittern, eine Beeinträchtigung der Diffusionsstrecke von Nährlösungen bzw. Nährstoffen und damit der initialen Versorgung der Keratinozyten nach der Transplantation mit dem Risiko von Nekrosen. Dies ist vor allem auf eine mangelhafte bzw. gestörte dermoepidermale Interaktion zurückzuführen, die die Neubildung bzw. Proliferation verschiedener Zelltypen (Fibroblasten und Keratinozyten) erfordert. Letztendlich führen diese Probleme zu einer verminderten mechanischen Stabilität des präformierten Transplantates und damit zu einem höheren Risiko einer mißlungenen Transplantation.

[0011] Demzufolge ist es bisher nicht gelungen, ein Hauttransplantat zu entwickeln, das mechanische Festigkeit mit einer optimalen physiologischen und mechanischen Anpassung an das Wundareal bei gleichzeitig geringem Infektionsrisiko verbindet und das in akuten Fällen innerhalb kurzer Zeiträume zur Verfügung steht. Ferner existiert im Stand der Technik bis jetzt kein Transplantat, das auch in der Lage ist, bei tiefen Verletzungen auch tiefere Wunden mit Granulationsgewebe auszufüllen, was dazu führt, daß bei tieferen Wunden zunächst die "natürliche" Ausfüllung der Wunde mit körpereigenem Granulationsgewebe abgewartet werden muß, bevor z. B. eine Keratinozytensuspension zur Abdeckung des Oberflächenareals aufgebracht werden kann. Weiterhin enthalten die bisher verwendeten Transplantate des Standes der Technik Kollagen, was dazu führt, daß die Synthese von Kollagen und physiologischem Granulationsgewebe in der Wunde gehemmt bzw. erschwert wird.

[0012] Folglich bestand eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Schaffung eines 2 Transplantatsystems, das ein geringes Infektionsrisiko für den Patienten darstellt. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, ein Transplantatsystem bereitzustellen, das eine optimale physiologische und mechanische Anpassung des Transplantates an das Wundareal erlaubt, wobei neben oberflächlichen Wunden insbesondere erstmals die Behandlung von tiefen Wunden unter Verwendung von fibrin- bzw. fibrinogenhaltigen Suspensionen autologer Zellen (Fibroblasten und Keratinozyten) ermöglicht werden sollte. Schließlich bestand eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von kollagenfreien Zellsus-

pensionen (Keratinozyten und Fibroblasten) zur Verwendung als autologe Transplantate.

[0013] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung eine Zwei-Komponenten Zusammensetzung zur Behandlung von Hautdefekten, Ulzera, und Wunden umfassend die folgenden Bestandteile:

- a) Eine Fibroblastensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente a); und
- b) eine Keratinozytensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente b).

[0014] Die Zwei-Komponenten Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung ist insbesondere dadurch charakterisiert, daß kein präformiertes Transplantat verwendet wird, wie z. B. bei der CEA-Transplantation, sondern daß ein System bestehend aus den zwei Suspensionen (Komponenten a) und b) zur Wundheilung eingesetzt wird. Dies hat gegenüber den vorgeformten Transplantaten auf der Basis von konfluent kultivierten Zellen entscheidende Vorteile. So bewirkt die erfindungsgemäß verwendete Zusammensetzung aus Fibroblasten und Keratinozyten, daß *in situ* eine verbesserte dermo-epidermale Interaktion auftritt. Für die mechanische Stabilität einer dermo-epidermalen Junktionszone ist die Ausbildung einer kontinuierlichen, nicht fragmentierten Lamina densa sowie die Bildung von Verankerungsfilamenten ("anchoring fibrils") von besonderer Bedeutung. Durch die mit der erfindungsgemäßen Zwei-Komponenten Zusammensetzung erreichte Inkubation von Keratinozyten mit Fibroblasten *in situ* wird die Entwicklung nativer extrazellulärer Matrixstrukturen ermöglicht. Das Prinzip der Synthese einer dermoepidermalen Junktionszone im Sinne eines physiologischen Basalmembran-Äquivalents durch die Zellen selbst wird daher durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung realisiert. Desweiteren bietet die erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung den Vorteil, daß die bei präformierten Transplantaten des Standes der Technik auftretenden mechanischen Probleme bei der Transplantation, wie z. B. Zerreißen oder Verkleben des Transplantates, nicht auftreten können. Die für die Zellen gemäß (a) und (b) verwendeten Suspensionskulturen werden vorzugsweise unter Reinraumbedingungen nach GMP-Standards hergestellt. Für den gesamte Herstellungsprozeß der erfindungsgemäßen Zusammensetzung sind Bedingungen der Reinheitsklasse A gemäß GMP-Standard bevorzugt, d. h., es dürfen nicht mehr als 3500 Partikel, die mindestens 0,5 µm groß sind und 0 Partikel, die mindestens 5 µm groß sind, pro Kubikmeter Luft vorhanden sein (bezügl. der Anforderungen an bestimmte Reinheitsklassen siehe "EG-Leitfaden einer guten Herstellungspraxis für Arzneimittel – mit Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer" (1998), 5. Auflage, Hrsg.: G. Auterhoff, Editio Cantor Verlag, Aulendorf). Die weiteren Verfahrensschritte zur Herstellung von Suspensionskulturen sind dem Fachmann bekannt. Die Bestandteile des Zwei-Komponenten Systems bestehend aus (a) und (b) umfassen neben den suspendierten Fibroblasten bzw. Keratinozyten in einer bevorzugten Ausführungsform jeweils Thrombin und Calciumchlorid, das durch vorzugsweise simultane Zugabe von Fibrinogen beim Auftragen in die Wunde (z. B. mittels einer Zwillingspritze) zu Fibrin reagiert und die Auspolymerisation der Matrix in der Wunde bewirkt. Dabei kann in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Zelllösung von Anfang an als Mischung mit Fibrinogenlösung vorliegen und bei der Applikation in das Empfängerareal durch Thrombin/Calciumchloridzugabe aktiviert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform findet die Mischung der Fibrino-

genlösung zu der Zellsuspension (die in diesem Fall bereits Thrombin und Calciumchlorid enthält) erst beim Aufbringen auf das Wundareal mittels Zwillingspritze statt. Demzufolge umfasst die vorliegende Erfindung auch Zwei-Komponentenzusammensetzungen die die erfindungsgemäße Zusammensetzung erst unmittelbar vor dem Einbringen in das Empfängerareal aufweisen, d. h. es sind auch solche Zusammensetzungen umfasst, bei denen die Fibrinmatrix und die Keratinozyten bzw. Fibroblastensuspensionen erst unmittelbar vor bzw. bei der Anwendung vereinigt werden.

[0015] Vorteilhafte Thrombinkonzentrationen liegen im Bereich von 50 bis 1000 i. E. Thrombin/ml, bevorzugt ist eine Konzentration von 200 bis 800 i. E./ml Lösung, besonders bevorzugt sind 500 i. E. Thrombin/ml. Vorteilhafte Calciumchloridkonzentrationen liegen im Bereich von 0.1 bis 50 mg/ml, bevorzugt ist 1 bis 10 mg/ml, besonders bevorzugt 5.88 mg/ml Calciumchlorid (alle Angaben stellen Endkonzentrationen dar). Eine ausführliche Darstellung von Fibrinklebern als biologische Zwei-Komponenten Systeme sowie deren Anwendung und Handhabung findet sich in EP 0 373 044, auf die hiermit in vollem Umfang Bezug genommen wird. Die verwendeten Kulturmedien sind auf den klinischen Einsatz am Menschen ausgerichtet.

[0016] Eine vorteilhafte Zelldichte der erfindungsgemäßen Zwei-Komponentenzusammensetzung beträgt sowohl für Bestandteil (a) als auch für Bestandteil (b) zwischen 0,5 bis 20 Millionen Zellen/ml Suspension, bevorzugt ist 1 bis 10 Millionen Zellen/ml, besonders bevorzugt 3 bis 6 Millionen Zellen/ml Suspension. Ein vorteilhaftes Zellmengenverhältnis der Bestandteile (a) zu (b) beträgt bei oberflächlichen Wunden 0,1 : 1 (a : b) bis 10 : 1 (a : b). Bevorzugt ist ein Zellmengenverhältnis von 0,5 : 1 bis 5 : 1 (a : b), besonders bevorzugt ist ein Verhältnis von 1 : 1. Bei tieferen Wunden ist ein Zellmengenverhältnis bevorzugt, daß einen Überschuß an Fibroblasten enthält, so daß ein besseres Auffüllen der tiefen Wunde mit Granulationsmaterial ermöglicht wird. Der genaue jeweilige Ansatz der Suspensionskulturen hängt vom Einsatzzweck ab und liegt im Rahmen der Kenntnisse des Fachmanns auf dem Gebiet der Zellkultur (s. z. B. Hunyadi et al., J. Dermatol. Surg. Oncol., 1988, Vol. 14, Seiten 75-78; O'Connor und Mulliken, Lancet, 1981, Vol. 10, Seiten 75-78).

[0017] Die sowohl in Komponente (a) als auch (b) enthaltene Fibrinmatrix besteht in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung aus einem handelsüblichen und arzneimittelrechtlich zugelassenen Fibrinkleber, wie z. B. "Tissucol Duo S Immuno" der Firma Baxter. Im Gegensatz zu den aus dem Stand der Technik bekannten (präformierten) Transplantaten auf Kollagenbasis wirkt die erfindungsgemäße Fibrinmatrix der Zwei-Komponentenzusammensetzung fördernd auf die Migration, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Clark et al., J. Invest. Dermatol. (1982), Vol. 79, Seiten 264-269; Tuan et al., Exp. Cell. Res. (1996), Vol. 223, Seiten 127-134; Ongenaes et al., Dermatol. Surg. (2000), Vol. 26, Seiten 447-451). Eine mögliche Erklärung für die o. g. Vorteile der erfindungsgemäßen Fibrinmatrix ist die Tatsache, daß die Anwesenheit von präformiertem Kollagen die Ausbildung weiterer dermaler Strukturen über einen Feed-Back Mechanismus hemmt (in der Art einer Produktinhibition), d. h. die Zellen erhalten bei Vorhandensein von Kollagen das Signal, die Proliferation herunterzuregulieren oder ganz einzustellen. Desweiteren wurde gezeigt, daß Fibroblasten in 3D-Kollagengelen apoptotisch werden (Fluck et al., J. Invest. Dermatol., 1998, Vol. 110, Seiten 153-157). Derartige Effekte sind jedoch für ein frisch eingebrachtes Transplantat von großem Nachteil, da eine Zellmigration und Proliferation unbedingt erforderlich ist, um ein

Verwachsen und Integrieren des Transplantates in die Wunde zu ermöglichen und eine intakte dermoepidermale Junktionszone auszubilden, die für ein stabiles physiologisches Transplantat erforderlich ist. Die erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung beseitigt dieses Problem und induziert physiologisches Granulationsgewebe, was zu einem physiologisch angepassten Matrixumbau durch die beteiligten Zelltypen selbst führt und somit eine verbesserte Textur des Unterhautgewebes sowie der dermoepidermalen Junktionszone bewirkt. Da zur Wundheilung unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung lediglich jeweils ein dünner Film der Komponenten (a) und (b) aufgetragen werden muß - in einer bevorzugten Ausführungsform findet flächendeckende Benetzung des Wundareals statt -, verringert sich gegenüber Transplantaten des Standes der Technik die Diffusionsstrecke für Nährstoffe, angiogenetische Faktoren und andere regulatorisch aktive Substanzen. Demzufolge stellt die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein Zwei-Komponentensystem bereit, das die Transplantatqualität, dessen Lebensdauer und die physiologische Integration des transplantierten Gewebes gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbessert.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft desweiteren in einer bevorzugten Ausführungsform eine Zwei-Komponenten Zusammensetzung gemäß dem obigen Anspruch, bei der die Fibroblasten- und/oder die Keratinozytensuspension aus autologen Spenderzellen des zu behandelnden Patienten gewonnen wurden. Zu diesem Zweck wird dem Patienten zunächst ein ca. 1 bis 2 cm<sup>2</sup> großes Vollhautbiopsat entnommen, das anschließend in einer vorteilhaften Ausführungsform 2 bis 28 Tage in Kultur genommen wird, wobei 4 bis 21 Tage bevorzugt und 14 bis 18 Tage besonders bevorzugt ist. Mit 1 ml autologer thrombinhaltiger Keratinozyten-(b) bzw. Fibroblastenlösung (a), die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform 500 i. E. humanes Thrombin enthalten, oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, in Fibrinogenlösung vorliegen und beim Einbringen in das Empfängerareal mit Thrombin/Calciumchloridlösung gemischt werden.

[0019] Die Komponenten (a) und (b), die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung 3 bis 6 x 10<sup>6</sup> Zellen umfassen, lassen bei oberflächlichen Defekten die Transplantation von ca. 100 cm<sup>2</sup> Wundfläche zu. Sind tiefere Wunden zu transplantieren, so ist ein größeres Mengenverhältnis von Fibroblasten zu Keratinozyten vorteilhaft, wobei das genaue Verhältnis von der Tiefe der Wunde abhängt und im Einzelfall vom Transplantateur festgelegt werden muß.

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform ferner eine Zusammensetzung, bei der die verwendeten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen im wesentlichen kollagenfrei sind. Dabei bedeutet "im wesentlichen kollagenfrei", daß kein Kollagen zugesetzt wird und bereits vorhandenes Kollagen durch Behandlung mit Kollagenase entfernt wird. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Kollagengehalt der verwendeten Zellsuspensionen des Zwei-Komponentensystems (a und b) auf 40 bis 60% der ursprünglich in der Suspensionskultur vorhandenen Ausgangsmenge reduziert, in einer bevorzugten Ausführungsform wird der Kollagengehalt auf 20 bis 40% der Ausgangsmenge reduziert; besonders bevorzugt ist eine Reduktion des Kollagengehaltes auf unter 20% der Ausgangsmenge. Allgemein gilt, daß ein besonders niedriger Kollagengehalt (unter 20% der Ausgangsmenge) sich besonders vorteilhaft auf die physiologische Integration des Transplantates auswirkt.

[0021] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der

vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, bei der die verwendeten Fibroblasten- und/oder Keratinozytensuspensionen subkonfluent in Suspensionskultur vorliegen. Die verwendeten Suspensionskulturen enthalten – im Gegensatz zu Transplantaten des Standes der Technik, die auf konfluenten, präformierten Kulturen basieren – Zellen, die nicht kontakthinhindert sind und die somit ein erhöhtes Migrations- und Proliferationspotential besitzen. Demzufolge stellen subkonfluent wachsende Fibroblasten bzw. Keratinozyten eine an das erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung angepasste Form der Kultur dar, die im Gegensatz zu präformierten Transplantaten eine biochemische und morphologische Anpassung des Transplantats an die Wunde ermöglicht, da die darin enthaltenen Zellen noch nicht vollständig ausdifferenziert sind. Demgemäß dient in einer bevorzugten Ausführungsform Komponente a der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zum flexiblen "aufgranulieren" profundere Wunden und Komponente b zum Abschluß bzw. zur Epithelbildung auf der Wundoberfläche.

[0022] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, bei der die Fibroblasten- und/oder die Keratinozytensuspension einen Fibrinkleber als Matrix enthält. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden handelsübliche Fibrinkleber verwendet, die arzneimittelrechtlich zugelassen sind, wie z. B. das Produkt "Tissucol Duo S Immuno" der Firma Baxter.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden kryokonservierte Zellen eingesetzt. Die Kryokonservierung dient dem Aufbewahren gewonnener Spenderzellen bzw. Zellen aus dem Spenderareal des Patienten, die nicht unmittelbar, sondern zu einem späteren Zeitpunkt transplantiert werden sollen. Die Kryokonservierung kann durchgeführt werden vor oder bei Erreichen der Subkonfluenz der jeweiligen Zellsuspension der Komponente (a) bzw. (b).

[0024] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die ein von bovinem Serum freies Medium umfasst. Die Verwendung von Medien ohne bovines Serum stellt insoweit einen Vorteil dar, als das Infektionsrisiko, beispielsweise mit BSE bzw. der neuen Form der Creutzfeld-Jacob Krankheit, das nach derzeitigem Stand der Forschung nicht auszuschließen ist, minimiert wird. Verwendung finden stattdessen, wie bereits oben ausgeführt, bereits seit langer Zeit auf dem Markt etablierte Fibrinkleber bzw. -matrices. Desweiteren ist der bevorzugte Fibrinkleber frei von bovinem Kollagen.

[0025] Ferner können die in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eingesetzten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen gentechnisch modifizierte Zellen umfassen. Vorteilhaft sind in diesem Zusammenhang Zellen, in die mittels dem Fachmann bekannter Verfahren Gene bzw. Vektoren eingeschleust werden, die beispielsweise für chemotaktische und angiogenetische Faktoren, Hormone, Peptide oder Strukturproteine kodieren und somit den transplantierten Zellen wünschenswerte Eigenschaften verleihen können.

[0026] Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Verwendung einer Zusammensetzung der hier in Rede stehenden Art zur Behandlung von chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, sowie zur Behandlung von Verbrennungswunden, posttraumatischen und postoperativen Wunddefekten nach Exzision, Dermabrasion und Laser-Ablation, sowie von nävöiden Hautveränderungen und Narben nach Dermabrasion.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in der Art, daß die Fibroblastensuspension (Komponente a) vor

der Keratinozytensuspension (Komponente b) in die Wunde gebracht wird. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird Komponente b wenige Sekunden bis Minuten nach der Komponente a) in die Wunde gebracht, in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt dieser Zeitraum Minuten bis mehrere Stunden, besonders bevorzugt sind Zeiträume von mehreren Tagen. Für beide Komponenten a und b gilt, daß die Suspensionen, die zunächst Fibrinogen und die jeweiligen Zellen umfassen, unmittelbar bei der Applikation in die Wunde in einer bevorzugten Ausführungsform mit der Thrombin und Calciumchlorid enthaltenden Lösung gemischt werden, so daß die Polymerisation der Fibrinmatrix in situ stattfinden kann. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegen die Zellen (Komponenten a und b) in Thrombin/Calciumchloridlösung vor und werden bei oder unmittelbar vor der Applikation in der Wunde erst zur endgültigen Zwei-Komponenten Zusammensetzung mit Fibrinogenlösung gemischt (mittels einer Zwillingspritze).

[0028] Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wobei die Fibroblastensuspension gemäß a) und/oder die Keratinozytensuspension gemäß b) vor der Verwendung mit einer Thrombinlösung gemischt werden. Für dieses Verfahren sind die für den oben genannten Verwendungsanspruch aufgeführten Zeitabstände bezüglich der Zugabe der Komponente (a) bzw. (b) bevorzugt.

[0029] Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wobei eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension gemäß (a) und/oder eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) vor der Verwendung mit einer Fibrinogenlösung gemischt werden. Auch für dieses Verfahren sind die für den oben genannten Verwendungsanspruch aufgeführten Zeitabstände bezüglich der Zugabe der Komponente (a) bzw. (b) bevorzugt.

[0030] Ferner können im Rahmen dieses Herstellungsverfahrens die Fibroblastensuspension und/oder die Keratinozytensuspension vor der Herstellung der Komponenten (a) und (b) mit Kollagenase behandelt werden. Dies bedeutet, daß in den Zellsuspensionen bzw. -kulturen vorhandenes Kollagen durch Behandlung mit Kollagenase entfernt wird. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Kollagengehalt der verwendeten Zellsuspensionen des Zwei-Komponentensystems (a und b) auf 40 bis 60% der ursprünglich in der Suspensionskultur vorhandenen Ausgangsmenge reduziert, in einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird der Kollagengehalt auf 20 bis 40% der Ausgangsmenge reduziert; besonders bevorzugt ist eine Reduktion des Kollagengehaltes auf unter 20% der Ausgangsmenge. Allgemein gilt, wie bereits oben erwähnt, daß sich ein besonders niedriger Kollagengehalt (unter 20% der Ausgangsmenge) vorteilhaft auf die physiologische Integration des Transplantates in die zu therapierende Wunde bzw. Läsion auswirkt.

[0031] Ferner ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Kultivierung Fibroblastensuspension gemäß (a) und/oder der Keratinozytensuspension gemäß (b) unter Hypoxie möglich. Hartmann et al. fanden bereits 1997 bzw. 1999, daß unter Hypoxie kultivierte Zellen (hier: Endothelzellen bzw. Tumorzellen) eine Hochregulierung des Angiogeninspiegels aufwiesen (Hartmann et al., J. Invest. Dermatol. 1997, Vol. 109, Seite 438; Hartmann et al., Cancer Res., 1999, Vol. 59, Seiten 1578–1583). Im Falle der Tumorzellen wird so sichergestellt, daß die für die Versorgung und das Wachstum des Tumors unabdingbare verstärkte Angiogenese induziert wird. Diesen Effekt nutzt die vorliegende Erfindung, da das Schicksal des transplantierten Gewebes in

besonderem Maße von einer schnellen Vaskularisierung des Wundareals abhängt. Somit führt die temporäre Hypoxie einer oder beider zu transplantierender Komponenten des Zwei-Komponenten Systems dazu, daß diese Zellen verstärkt angiogenetische Faktoren sezernieren und damit eine Vaskularisierung des Wundareals fördern. Die durch die Hypoxie initiierte Vaskularisierung stellt somit eine Anpassung des Gewebes bzw. der Zellen an eventuell auftretende Sauerstoffmangelzustände dar.

[0032] Ferner können der Fibroblastensuspension (Komponente a) und/oder der Keratinozytensuspension (Komponente b) angiogenetische Faktoren zugesetzt werden. Auch diese bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung basiert auf dem Gedanken, daß eine möglichst schnelle Vaskularisierung des transplantierten Areals wünschenswert und vorteilhaft ist. Als angiogenetische Faktoren kommen z. B. VEGF, Angiogenin und verwandte Peptidfaktoren in Frage. Die erforderliche Dosierung und Applikation dieser Faktoren kann vom Fachmann routinemäßig auf die jeweilige Anwendung abgestimmt werden.

[0033] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Zelltransplantat, erhältlich durch ein Verfahren wie vorstehend beschrieben.

[0034] Gemäß den voranstehend gemachten Ausführungen ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung gelungen, eine Zwei-Komponenten Zusammensetzung zur Behandlung von Hautdefekten, Ulzera und Wunden bereitzustellen, die – im Gegensatz zu den präformierten Systemen des Standes der Technik – eine Transplantation von Fibroblasten und Keratinozyten erlaubt, die eine in situ Anpassung der subkonfluenten Zellen an das umgebende Wundgewebe erlaubt und sowohl die beschleunigte Bildung von Granulationsgewebe in der Wunde, als auch eine rasche Epithelbildung induziert. Somit können mit den vorliegenden Zusammensetzungen bzw. Verfahren zu deren Herstellung erstmals auch profunde Wunden transplantiert werden, ohne daß auf die körpereigene Granulation der Wunde gewartet werden muß. Die weiteren Nachteile der herkömmlichen Transplantate wie mechanische Instabilität und Infektionsgefahr werden ebenfalls beseitigt bzw. vermindert.

[0035] Die vorliegende Erfindung soll abschließend in Form eines Beispiels erläutert werden.

#### Beispiel

[0036] Eine dem Patienten entnommene Hautbiopsie wird nach Desinfektion in eine sterile Umgebung gebracht, in der die Bedingungen nach Reinheitsklasse A gemäß GMP-Richtlinien herrschen. Dies geschieht beispielsweise durch Übertragung der Probe in einen Arbeitsisolator mittels eines Transferisolators, wobei jeweils nahezu vollständige Keimfreiheit herrscht.

[0037] Zur Herstellung der Zellsuspensionen bzw. -kulturen für die Komponenten a und b werden folgende Schritte, vorzugsweise unter den in Klammern angegebenen Reinheitsbedingungen gemäß GMP-Standard, durchgeführt:

- Präparation der Hautbiopsie, mechanische Entfernung von Dermisresten (A)

- Spülung mit 70%-igem Ethanol und dann mit PBS-Puffer (A)

- Enzymatischer Verdau zur Ablösung der Epidermis von der Dermis (mindestens 2,4 U/ml Dispase, entweder 4 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C) (D)

- Trennung der Epidermis von der Dermis durch "Abziehen" (A)

- Zerkleinerung der Epidermis in einer PBS-Pufferlösung mittels sterilen Instrumente, beispielsweise Sche-

ren oder Pinzetten (A)

- Enzymatische Dissoziation einzelner Zellen durch Trypsinierung (0,5%-ige Trypsinlösung; 30 Minuten bei 37°C) (A oder D)

- Stoppen der Trypsinierung, beispielsweise durch Zugabe von Serum (A)

- Zentrifugation (zwischen 1500 und 4000 upm; bei Raumtemperatur; etwa 5 bis 10 Minuten) (D)

- Absaugen des Überstandes und Resuspension der Zellen in einem geeigneten Keratinozyten- bzw. Fibroblastennährmedium (z. B. in MEM- oder RPMI-Medium) (A)

- Aussäen der Zellen in Kulturflaschen (5000–50000 Zellen/cm<sup>2</sup>) (A)

- Kultivierung der Zellen bis zur Subkonfluenz (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Mediumwechsel nach Bedarf, in der Regel jeden zweiten oder dritten Tag) (D)

[0038] Die Herstellung einer autologen Keratinozyten- (b) bzw. Fibroblastensuspension (a) der Zwei-Komponenten Zusammensetzung geschieht dann folgendermaßen:

- Enzymatische Dissoziation einzelner Zellen durch Trypsinierung (0,5%-ige Trypsinlösung; 30 Minuten bei 37°C) (A oder D)

- Stoppen der Trypsinierung, beispielsweise durch Zugabe von Serum (A)

- Zentrifugation (zwischen 1500 und 4000 upm; bei Raumtemperatur; etwa 5 bis 10 Minuten) (D)

- Resuspension der Zellen und Aufnahme der Zellen in Thrombin/Calciumchlorid- oder Fibrinogenlösung (4 Mio Zellen/0,5 ml (A)).

[0039] Nicht in Thrombinlösung aufgenommene Zellen werden entweder sofort oder nach erneuter Weiterkultivierung bis zur Subkonfluenz kryokonserviert.

[0040] Vor der Auftragung der Zwei-Komponenten Zusammensetzung wird das Wundareal gereinigt und vorbereitet, z. B. durch Dermabrasion. Auf die entsprechenden Stellen wird zunächst die Suspension der autologen kultivierten Fibroblasten in Thrombin/Calciumchloridlösung aufgetragen (Komponente a), wobei die Verwendung einer Zwillingspritze vorteilhaft ist, bei der eine Kammer die zu transplantierenden Fibroblasten in Thrombin/Calciumchloridlösung enthält und die andere Kammer Fibrinogenlösung, so daß eine Mischung der Zellen in Thrombin/Calciumchloridlösung mit Fibrinogen in situ stattfindet. Hierbei ist zu beachten, daß die Bildungsgeschwindigkeit des Fibrins aus Fibrinogen und damit die Gerinnung über die Thrombinkonzentration steuerbar ist und somit vom Fachmann die gewünschte Gerinnungszeit eingestellt werden kann.

[0041] Anschließend wird entweder direkt nach dem Auftragen der Komponente (a), bzw. einige Stunden oder Tage später (bezügl. der bevorzugten Zeiträumen s. o., Beschreibung) die Lösung (b), also Keratinozyten in Thrombin/Calciumchloridlösung aufgetragen, wobei sich ebenfalls in der zweiten Kammer einer Zwillingspritze Fibrinogenlösung befindet und eine Mischung der Fibrinogenlösung mit den Zellen in Thrombin/Calciumchloridlösung unmittelbar vor oder bei der Applikation in das Empfängerareal stattfindet.

[0042] Nun befindet sich die vollständige Zwei-Komponenten Zusammensetzung im Empfängerareal, so daß eine physiologisch und morphologisch angepasste Regeneration des betroffenen Bereiches stattfinden kann.

#### Patentansprüche

1. Zwei-Komponenten Zusammensetzung zur Be-

handlung von Hautdefekten, Ulzera, und Wunden umfassend die folgenden Komponenten:

- a) Eine Fibroblastensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente a); und
  - b) eine Keratinozytensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente b).
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, bei der die Fibroblasten- oder die Keratinozytensuspension oder die Fibroblasten- und die Keratinozytensuspension aus autologen Spenderzellen des zu behandelnden Patienten gewonnen wurden.
  3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die verwendeten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen im wesentlichen kollagenfrei sind.
  4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die verwendeten Fibroblasten- oder Keratinozytensuspensionen oder die Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen subkonfluent in Suspensionskultur vorliegen.
  5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei der die Fibroblasten- und die Keratinozytensuspension einen Fibrinkleber als Matrix enthält.
  6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die kryokonservierte Zellen umfaßt.
  7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend ein Medium frei von bovinem Serum.
  8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei der die Fibroblasten- oder Keratinozytensuspensionen oder die Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen gentechnisch modifizierte Zellen umfassen.
  9. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Behandlung von chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, zur Behandlung von Verbrennungswunden, von posttraumatischen Wunddefekten, von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder Laser-Ablation von Hautveränderungen oder zur Behandlung von nävöiden Hautveränderungen und von Narben nach Dermabrasion.
  10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblastensuspension gemäß (a) vor der Keratinozytensuspension gemäß (b) in die Wunde gebracht wird.
  11. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblastensuspension gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß (b) vor der Verwendung mit einer Thrombinlösung gemischt werden.
  12. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension gemäß (a) oder eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) oder eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension gemäß (a) und eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) vor der Verwendung mit einer Fibrinogenlösung gemischt werden.
  13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblastensuspension gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß (b) vor dem Mischen mit Thrombin oder Fibrinogen mit Kollagenase behandelt werden.
  14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblastensuspension

gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß (b) unter Hypoxie kultiviert werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Fibroblastensuspension gemäß (a) oder der Keratinozytensuspension gemäß (b) oder der Fibroblastensuspension gemäß (a) und der Keratinozytensuspension gemäß (b) angiogenetische Faktoren zugesetzt werden.

16. Zelltransplantat, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15.